

FLUNITRAZEPAM – BENZODIAZEPINA WYKORZYSTYWANA W CELACH PRZESTĘPCZYCH. IDENTYFIKACJA METODĄ CHROMATOGRFII GAZOWEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (GC/MS)

Bogdan Szukalski¹, Marta Bykas-Strękowska², Dariusz Blachut²,
Ewa Taracha¹

¹Zakład Neurochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

²Zakład Kryminalistyki i Chemii Specjalnej Agencji Bezpieczeństwa
Wewnętrznego

FLUNITRAZEPAM – A DRUG USED FOR CRIMINAL PURPOSES. IDENTIFICATION IN URINE BY GC/MS

ABSTRACT – Conditions for separation and identification of flunitrazepam and its main metabolite 7-aminoflunitrazepam were developed, and applied to the analysis of urine obtained from a patient undergoing detoxification from opioid dependence, who was receiving methadone and clorazepate, as well as flunitrazepam for sleep disturbances. Aside from flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam, the urine was found to contain methadone and its metabolite EDDP, a metabolite of the drug called aminophenazone or metamizol, and nordiazepam (a metabolite of clorazepate). Nicotine and its three metabolites: nornicotine, 3-hydroxynicotine, and cotinine were also present, because the patient was a tobacco smoker.

Satisfactory separation of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam was obtained after transformation of 7-aminoflunitrazepam into a pentafluoropropionate derivative.

The conditions used for urine extraction and for separation and identification of the urine extract components by gas chromatography with mass detection by electron ionisation (EI) allow to confirm the presence of flunitrazepam in cases of suspicions that it was administered for criminal purposes.

Key words: flunitrazepam, determination in urine.

WSTĘP

Flunitrazepam (Rohypnol®, FN), N-metylo-2-fluoropochodna nitrazepamu, jest agonistą receptora benzodiazepinowego, zlokalizowanego w ośrodkowym układzie nerwowym. Wykazuje działanie uspokajające dziesięciokrotnie silniejsze od diazepam, a ponadto: nasenne, przeciwłękowe, zwiotczające mięśnie i przeciwdrgawkowe, jednak efekt nasenny zdecydowanie dominuje nad pozostałymi kierunkami działania. Stosowany jest dożylnie lub doustnie w dawkach 1-2 mg w zaburzeniach snu na różnym tle oraz w premedykacji jako lek wprowadzający do znieczulenia ogólnego. Flunitrazepam znalazł również zastosowania pozamedyczne, gdyż bywa używany przez osoby uzależnione do wzmacniania efektów działania alkoholu i marihuany (3), a w latach 90. zaczęto go wykorzystywać w celach przestępczych do oszalamiania (ang.: *drugging*) z zamiarem dokonania gwałtu lub innych przestępstw (13, 17). Ponieważ dobrze rozpuszcza się w wodzie, nie ma zapachu ani smaku, może być podawany w napojach i drinkach bez wiedzy osób, na których planuje się dokonanie przestępstwa. Poza oszołomieniem, dezorientacją i sennością wywołuje on u tych osób zaburzenia pamięci utrudniające identyfikację sprawców przestępstwa (2). Stąd prawdopodobnie wywodzi się jedna z jego „ulicznych” nazw – „Forget me”. Efekty działania flunitrazepamu pojawiają się 20-30 minut po przyjęciu leku i utrzymują przez kilka godzin. Ulegają wyraźnemu nasileniu, gdy jest on przyjmowany razem z alkoholem (12). Przy przedawkowaniu flunitrazepamu występuje ataksja, hipotonia, depresja układu oddechowego, śpiączka. Opisano również liczne przypadki zejść śmiertelnych (4). Poza działaniem ułatwiającym dokonanie przestępstwa bywa on, częściej niż inne benzodiazepiny, przyczyną wypadków drogowych (16).

W piśmiennictwie anglojęzycznym narkotyki wykorzystywane w celach przestępczych, głównie w celu dokonania gwałtu, określane są trudnymi do przełożenia na język polski terminami „the date-rape drugs” i „acquaintance-rape drugs” (9, 18). Oprócz flunitrazepamu do grupy tej należy kwas γ -hydroksymasłowy (GHB), jego lakton (GBL), butandiol (BDO) (19, 20) oraz ketamina.

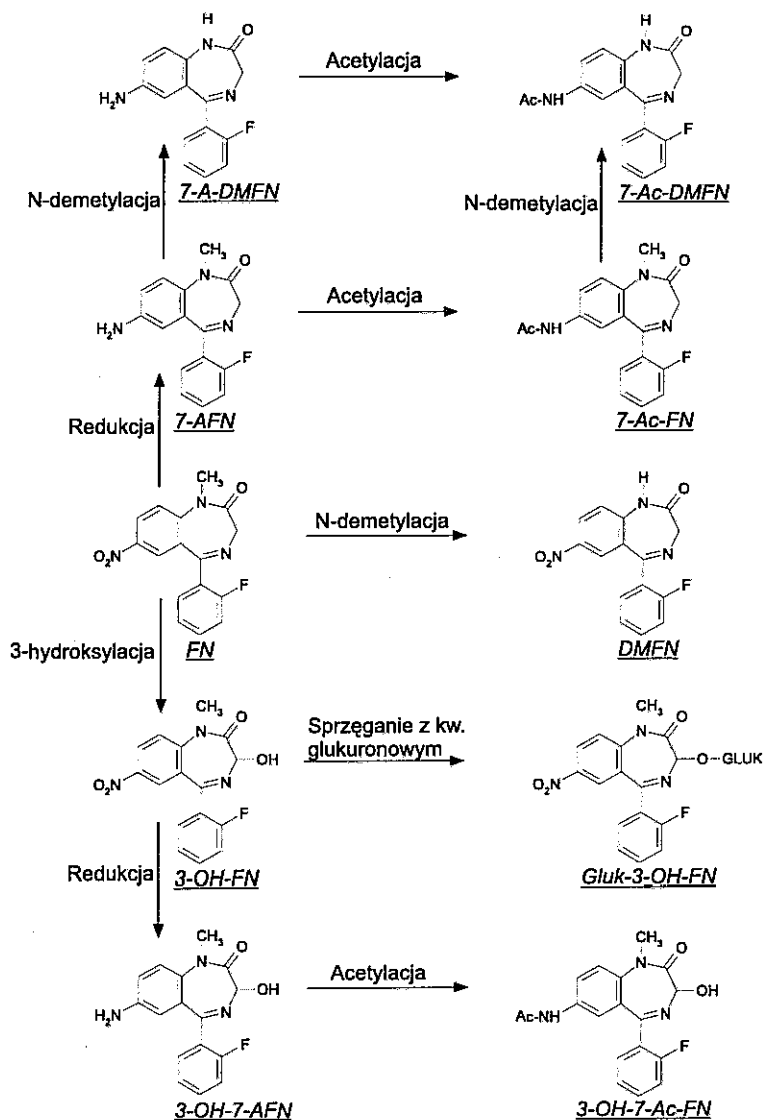
W roku 1996 w Stanach Zjednoczonych zakazano wypisywania recept, importu i sprzedaży flunitrazepamu, jednakże duże jego ilości są przemywane, głównie z Meksyku, i sprzedawane nielegalnie pod różnymi nazwami ulicznymi. W tym samym roku zanotowano w USA ponad 3000 przypadków przestępczego stosowania flunitrazepamu (21). O skali zjawiska i stopniu zagrożenia może świadczyć wydanie specjalnego aktu prawnego „Drug Induced Rape Prevention and Punishment Act of 1996”, który stanowi, że podawanie komukolwiek bez jego wiedzy, w celach przestępczych, środków pozostających pod kontrolą prawną jest zagrożone karą pozbawienia wolności do lat 20 (10). W większości krajów Europy Zachodniej środek ten jest nadal dość łatwo dostępny (m.in. na recepty), jednakże i tam podejmowane są obecnie działania uniemożliwiające lub utrudniające przestępcze stosowanie leku. I tak koncern Roche Products Ltd produkuje obecnie flunitrazepam w postaci słabo rozpuszczalnego kompleksu, który dodany do napoju zabarwia go na łatwo dostrzegalny kolor niebieski. Nie można go więc szybko i w sposób niezauważalny podać w alkoholu lub soku.

W Polsce też należy się poważnie liczyć ze stosowaniem flunitrazepamu i innych „date-rape drugs” w celach przestępczych, gdyż jest sprawdzoną prawidłowością, że nowe narkotyki, „modne” w Stanach Zjednoczonych i w Europie Zachodniej, po kilku latach pojawiają się na naszym rynku narkotykowym. O tym, że w opinii handlarzy narkotyków nielegalny flunitrazepam znajdzie w Polsce nabywców, może świadczyć próba przemytu 50 tysięcy tabletek (4860 tzw. „listków” lub „blistrów”) tego środka. Przemyt skonfiskowano podczas kontroli litewskiego samochodu na przejściu granicznym w Ogrodnikach w połowie 2001 roku.

Flunitrazepam podany doustnie szybko i prawie całkowicie, bo w 80-90%, wchłania się z przewodu pokarmowego. Ulega on intensywnym przemianom, przy czym znaczna część (10-15%) zostaje zmetabolizowana w wątrobie podczas tzw. „pierwszego przejścia”. Maksymalne stężenie flunitrazepamu we krwi występuje 60-70 minut po przyjęciu leku. Gdy dawka wynosi 1 mg stężenie to osiąga wartość około 10 ng/ml. Lek szybko przenika do płynu mózgowo-rdzeniowego i mleka matki. Stopień wiązania flunitrazepamu z białkami osocza krwi wynosi 78%, objętość dystrybucji 3-5 l/kg, biodostępność 80-90%, a okres półtrwania 16-35 godzin.

Metabolizm flunitrazepamu w organizmie człowieka jest bardzo intensywny, gdyż w postaci niezmienionej wydalą się zaledwie 0,2% dawki. Przemiany polegają na redukcji grupy nitrowej do aminowej z utworzeniem 7-aminoflunitrazepamu (7-AFN) i jego acetylacji do 7-acetamidoflunitrazepamu (7-Ac-FN), N-demetylacji do desmetyloflunitrazepamu (DMFN), 3-hydroksylacji do 3-hydroksyflunitrazepamu (3-OH-FN). Metabolity z grupą hydroksylową ulegają sprzęganiu z kwasem glukuronowym do odpowiednich glukuronianów (Gluk-3-OH-FN) (Ryc. 1). Około 90% metabolitów wydalą się z moczem, a tylko 10% z kałem. We krwi występuje głównie macierzysty flunitrazepam i jego najważniejszy metabolit 7-aminoflunitrazepam (14). Desmetyloflunitrazepam (DMFN) pojawia się we krwi jedynie w śladowych ilościach.

Do wykrywania obecności benzodiazepin w materiale biologicznym najczęściej stosowane są metody immunologiczne, wśród których szczególną rolę odgrywa metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA). Wykorzystuje ona gotowy zestaw odczynników wykalibrowany przez producenta na nordiazepam, który służył jako hapten do produkcji przeciwciał przeciwbenzodiazepinowych. Kalibracja testu benzodiazepinowego FPIA na nordiazepam wynika z faktu, że w ten związek przekształca się w organizmie człowieka większość leków posiadających w swej strukturze ugrupowanie benzodiazepinowe. Metoda ta pozwala na grupową identyfikację benzodiazepin oraz określenie ich przybliżonego stężenia, które jest wypadkową stężeń i reaktywności krzyżowych wszystkich związków uczestniczących w reakcji lek-przeciwciało. Nie nadaje się ona jednak do identyfikacji w badanym materiale poszczególnych benzodiazepin, a więc również flunitrazepamu, a ponadto granice wykrywalności benzodiazepin tą metodą (12 ng/ml w surowicy i 40 ng/ml w moczu) są niewystarczające dla flunitrazepamu, tym bardziej w przypadkach analiz wykonywanych kilka dni po przyjęciu tego leku.



Ryc. 1. Przemiany flunitrazepamu w organizmie człowieka.

Oznaczenia:

FN = flunitrazepam; 3-OH-FN = 3-hydroksyflunitrazepam; DMFN = desmetyloflunitrazepam; Gluk-3-OH-FN = glukuronian 3-hydroksyflunitrazepamu; 7-AFN = 7-aminoflunitrazepam; 7-A-DMFN = 7-aminodesmetyloflunitrazepam; 3-OH-7-AFN = 3-hydroksy-7-aminoflunitrazepam; 7-Ac-FN = 7-acetamidoflunitrazepam; 7-Ac-DMFN = 7-acetamidodesmetyloflunitrazepam; 3-OH-7-Ac-FN = 3-hydroksy-7-acetamidoflunitrazepam.

Z uwagi na to, że flunitrazepam należy do benzodiazepin o silnym działaniu (jest stosowany w dawkach nieprzekraczających 2-3 mg) i ulega intensywnym przemianom metabolicznym, jego stężenie zarówno we krwi jak i w moczu jest relatywnie małe (1-15 ng/ml) (5).

Ponadto gwałt może wywołać u ofiary stan psychiczny utrudniający podjęcie decyzji o zgłoszeniu przestępstwa odpowiednim władzom. Składa się na to uczucie zażenowania, strachu, obawa odrzucenia oraz brak zaufania do policji i sądownictwa, a wywołana przez flunitrazepam amnezja jeszcze tę decyzję opóźnia i powoduje, że zgłoszenie ma zwykle miejsce kilka dni po zdarzeniu, co jeszcze bardziej utrudnia wykrycie flunitrazepamu we krwi i w moczu (6, 7).

Wykrycie tak małych stężeń wymaga zastosowania metod odznaczających się dużą wykrywalnością, takich jak chromatografia gazowa z detekcją mas (GC/MS). Pozwala ona w odpowiednio dobranych warunkach rozdzielić mieszaninę benzodiazepin oraz zidentyfikować flunitrazepam i towarzyszące mu metabolity w stężeniach rzędu kilku nanogramów na mililitr (1, 11). Takie parametry metody czynią ją przydatną dla potrzeb organów ścigania i sądu, mających ustalić fakt podstępного podawania niedozwolonych środków oraz udowodnić winę sprawców przestępstwa. Celem naszej pracy było właśnie opracowanie takich warunków ekstrakcji z moczu flunitrazepamu i jego głównego metabolitu 7-aminoflunitrazepamu oraz ich rozdzielenia i identyfikacji metodą GC/MS, które można byłoby zastosować w przypadku podejrzenia o popełnieniu przestępstwa.

Warto dodać, że alternatywnym materiałem biologicznym, pozwalającym na stwierdzenie przyjęcia narkotyku, a nawet ustalenie „historii” jego stosowania w określonym przedziale czasowym, są włosy. Badanie włosów za pomocą odpowiednio czułej i specyficznej metodyki pozwala wykryć nawet jednorazowe przyjęcie narkotyku. Wśród kilku prac opublikowanych na ten temat na uwagę zasługuje praca Negrusza i wsp. (15), którzy wykorzystując ekstrakcję na fazie stałej (SPE) oraz metodę chromatografii gazowej z detekcją mas z chemiczną jonizacją ujemną (GC-MS-NCI) oznaczali pikogramowe ilości flunitrazepamu i 7-aminoflunitrazepamu. Opracowana przez nich metodyka pozwoliła potwierdzić przyjęcie terapeutycznej dawki flunitrazepamu 28 dni po jej podaniu.

MATERIAŁ I METODY

Wzorzec flunitrazepamu (FN) pochodził z Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA), wzorzec 7-aminoflunitrazepamu (7-AFN) z firmy Lipomed (Szwajcaria), bezwodnik kwasu pentafluoropropionowego (PFPA) z firmy Supelco. Pozostałe odczynniki i rozpuszczalniki pochodziły z renomowanych firm i nie wymagały dodatkowego oczyszczania.

Flunitrazepam i 7-aminoflunitrazepam przygotowano w postaci roztworów o stężeniu 10 mg/ml w mieszaninie metanolu i octanu etylu (4:1).

Materiałem, w którym identyfikowano flunitrazepam i 7-aminoflunitrazepam, był mocz 24-letniego mężczyzny uzależnionego od opiatów, leczonego w Oddziale De-

toksykacyjnym Instytutu Psychiatrii i Neurologii. Pacjent z powodu zaburzeń snu otrzymał jednorazowo 2 mg flunitrazepamu. Mocz zebrano 11,5 godziny po przyjęciu leku. Oprócz flunitrazepamu pacjent otrzymywał metadon w dawce 2,5 mg/dobę oraz klorazepat w dawce 50 mg/dobę.

Wysabnianie benzodiazepin z moczu prowadzono metodą ekstrakcji ciecz-ciało stałe (Solid Phase Extraction-SPE) przy użyciu kolumnienek z fazą mieszaną (Bond Elut Certify, Varian), umieszczonych w urządzeniu z regulowaną próżnią (Analytchem Vac Elut SPS 24™-Varian).

Kolumnienki do ekstrakcji przygotowywano przepuszczając pod obniżonym ciśnieniem 2 ml metanolu i 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego (pH 6), a następnie nie pozwalając fazie wyschnąć наносzono 5 ml odwirowanego moczu zmieszanego z 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego. Złoże wypełniające kolumnienki płukano 1M kwasem octowym (1 ml) i suszono przez 5 minut przy maksymalnym przepływie powietrza, a następnie ponownie płukano metanolem (6 ml) i suszono przez 2 minuty. Elucję badanych związków prowadzono 2% (v/v) roztworem amoniaku (25%) w octanie etylu (2 ml), eluat odparowywano do sucha w strumieniu azotu a suchą pozostałość rozpuszczano w 50 ml octanu etylu. Na kolumnę chromatograficzną podawano 1 µl ekstraktu, co odpowiada 0,1 ml moczu.

Anality analizowano również w postaci pentafluoropropionowych pochodnych.

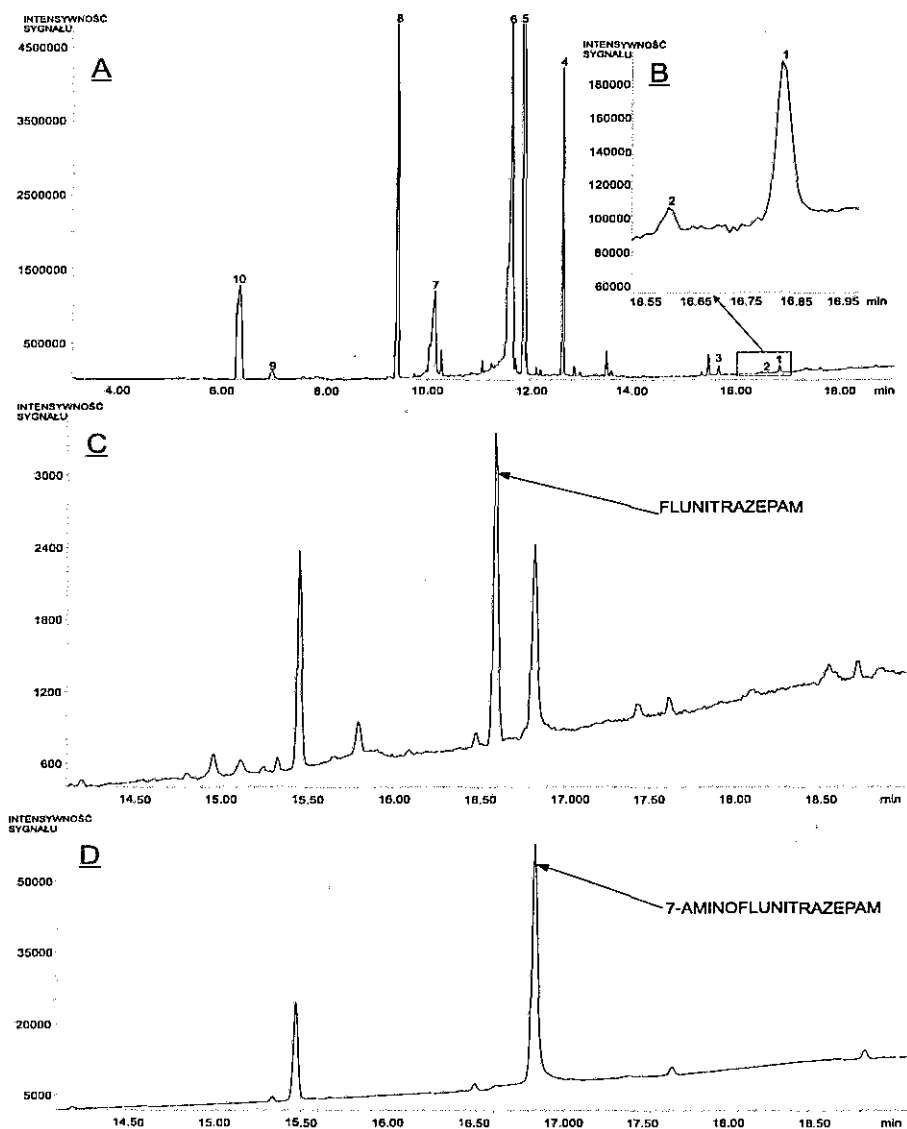
Otrzymywanie pochodnych pentafluoropropionowych

Roztwory robocze (300 µl) odparowywano do sucha w temperaturze 40°C w strumieniu argonu, dodawano 25 µl odczynnika PFPA i ogrzewano w temperaturze 60°C przez 30 minut. Po ochłodzeniu zawartość probówek odparowywano do sucha. Do suchej pozostałości dodawano 30 µl octanu etylu i 1 µl roztworu używano do analizy metodą GC/MS.

Analizę prowadzono metodą GC/MS przy użyciu chromatografu gazowego HP 6890 połączonego z detektorem masowym HP 5973. Do rozdzielu użyto kolumnę kapilarną HP-5MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 0,25 µm. Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 250°C, temperatura źródła jonów 230°C, przepływ gazu nośnego (helu) 0,6 cm³/min. Temperaturę pieca zaprogramowano następująco: początkowa temperatura 110°C utrzymywała się przez 2 minuty, następnie z przyrostem o 15°C/min wzrastała do 255°C, po czym następował ponowny jej wzrost o 8°C/min do 300°C, którą utrzymywano przez 5 minut. Czas trwania analizy wynosił ok. 23 minuty.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli 1 zestawiono związki występujące w badanym moczu, ich wzory sumaryczne, czasy retencji i główne jony widm MS. Oprócz flunitrazepamu i 7-aminoflunitrazepamu w moczu występował metadon i jego metabolit: 2-etylideno-1,5-dimetylo-3,3-difenylopirolidyna (EDDP), 4-amino-2,3-dimetylo-1-fenylo-3H-pirazol-5-on,



Ryc. 2. Chromatogram ekstraktu moczu.

(A). Chromatogram całkowitego prądu jonowego (TIC) ekstraktu moczu. Zidentyfikowane związki i ich parametry analityczne zestawiono w tabeli 1. (B). Powiększony fragment chromatogramu w obszarze występowania FN i 7-AFN. (C). Chromatogram SIM (monitorowano jony charakterystyczne dla FN: 312, 286, 285, 266, 238) ekstraktu moczu. (D). Chromatogram SIM (monitorowano jony charakterystyczne dla 7-AFN: 238, 255, 254, 282) ekstraktu moczu. Chromatogramy zarejestrowano w następujących warunkach analizy: kolumna kapilarna HP-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm, detekcja MS, program temperatury 100°C (2,0 min), przyrost 15°C/min do 255°C (1,0 min), przyrost 8°C/min do 300°C (5min), opcja nastrzyku: dozowanie bez dzielenia próbki (splitless).

będący metabolitem leku o nazwie aminofenazon lub metamizol, nordiazepam, który jest metabolitem klorazepatu oraz nikotyna i jej trzy metabolity: normikotyna, kotynina i 3-hydroksykotynina.

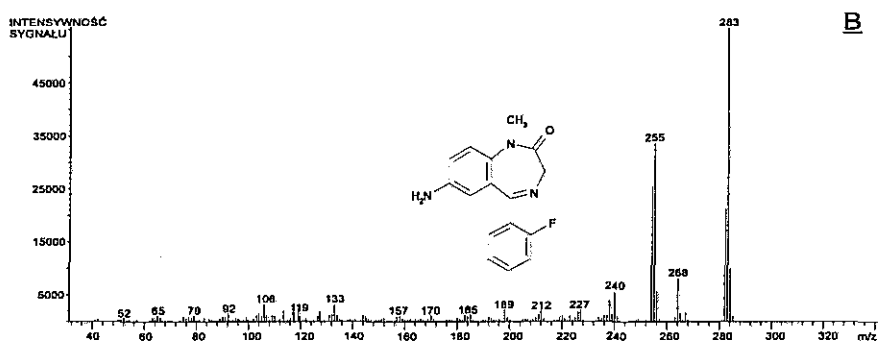
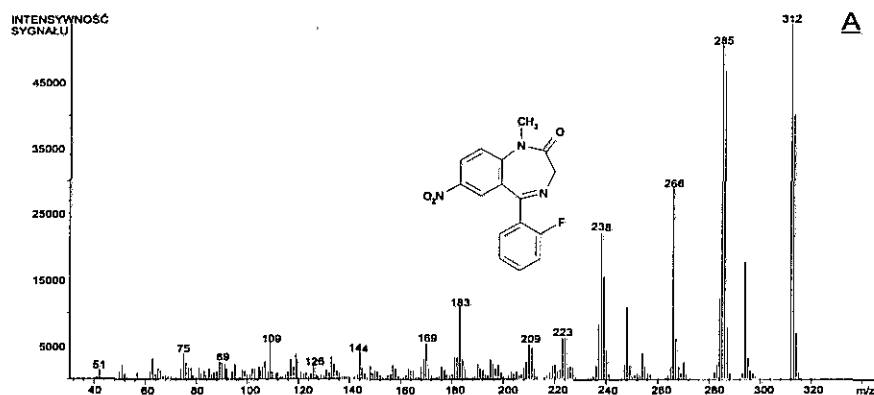
TABELA 1
Parametry analityczne zidentyfikowanych związków

Nr.	nazwa związku	czas retencji [min]	wzór sumaryczny	Podstawowe jony [m/z] widma masowego ^a
1	7-aminoflunitrazepam	16,83	C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O	283,255,254,282,240
2	flunitrazepam	16,60	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₂	312,285,313,266,238
3	nordiazepam	15,67	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	242,241,269,270
4	metadon	12,63	C ₂₁ H ₂₇ NO	72,165,223,294,309
5	metabolit metadonu EDDP ^b	11,88	C ₂₀ H ₂₃ N	277,276,262,220,165
6	4-amino-2,3-dimetylo-1-fenilo-3H-pirazol-5-on ^c	11,64	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	203,56,84,93
7	3-hydroksykotynina	10,14	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂	106,192,135,93
8	kotynina	9,43	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	98,176, 118,119
9	normikotyna	7,00	C ₉ H ₁₂ N ₂	119,70147,80
10	nikotyna	6,37	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	84,133,161,162

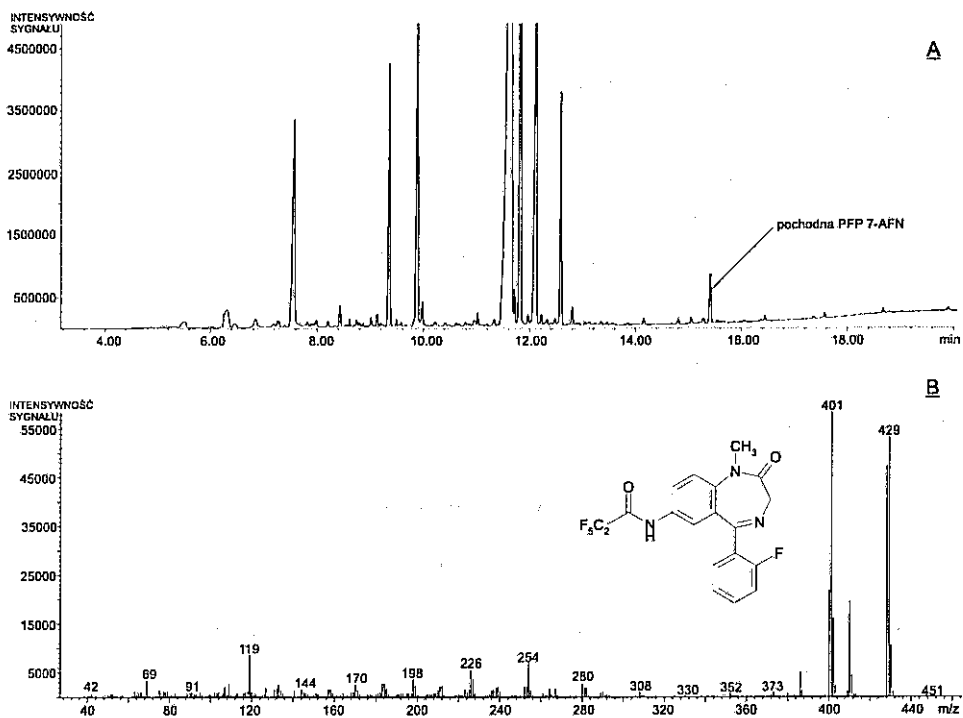
a) – podkreśleniem oznaczono wartość liczbową jonu o największej intensywności na widmie MS

b) – EDDP: 2-etylideno-1,5-dimetylo-3,3-difenylopirolidyna

c) – metabolit leku o nazwie aminofenazon lub metamizol



Ryc.3. Widma MS i wzory strukturalne: flunitrazepamu (A), 7-aminoflunitrazepamu (B).



Ryc.4. Chromatogram TIC ekstraktu moczu zawierającego 7-aminoflunitrazepam po derywacji bezwodnikiem kwasu pentafluoropropionowego (A). Widmo MS i wzór strukturalny pochodnej pentafluoropropionowej 7-aminoflunitrazepamu (B).

W celu zwiększenia czułości i specyficzności procesu analitycznego stosowano opcję rejestracji lub monitorowania wybranych jonów (*selected ion monitoring, SIM*) charakterystycznych dla danego związku.

Wybierając jony [m/z] typowe dla FN (312, 286, 285, 266, 238) i dla 7-AFN (238, 255, 254, 282) zidentyfikowano na chromatogramach oba związki.

Zastosowano także derywację ekstraktu odczynnikiem PFP. W wyniku derywacji powstała pentafluoropropionowa pochodna 7-aminoflunitrazepamu o lepszych właściwościach chromatograficznych (mniejszej absorpcji na kolumnie i skróconym czasie retencji – z 16,83 do 15,41 min). Dzięki temu pik na chromatogramach był wysoki i charakteryzował się małą szerokością połówkową (ryc. 4).

STRESZCZENIE

Opracowano warunki rozdziału i identyfikacji flunitrazepamu oraz jego głównego metabolitu 7-aminoflunitrazepamu i zastosowano je do analizy moczu pa-

cyjenta uzależnionego od opiatów, który w toku kuracji odtruwającej otrzymywał metadon i klorazepat, a z powodu zaburzeń snu – flunitrazepam. Poza flunitrazepamem i 7-aminoflunitrazepamem w moczu wykryto metadon, jego metabolit EDDP, metabolit leku o nazwie aminofenazon lub metamizol oraz nordiazepam (metabolit klorazepatu). Mocz zawierał również nikotynę i jej trzy metabolity: nornikotynę, kotyninę i 3–hydroksykotyninę, ponieważ pacjent palił tytoń.

Zadowalający rozdział flunitrazepamu i 7-aminoflunitrazepamu uzyskano po przeprowadzeniu 7-aminoflunitrazepamu w pochodną pentafluoropropionową.

Zastosowane w pracy warunki ekstrakcji moczu oraz rozdziału i identyfikacji składników ekstraktu metodą chromatografii gazowej z detekcją mas w opcji jonizacji elektronowej (EI) pozwalają potwierdzić obecność flunitrazepamu w przypadku podjęcia, że był on podany w celach przestępczych.

Słowa kluczowe: flunitrazepam, oznaczenie w moczu.

PIŚMIENNICTWO

1. Berthault F., Kintz P., Mangin P.: *Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of flunitrazepam and four metabolites in serum*. J. Chromat. 1996, 685, 383-387.
2. Burregi S.R., Ferini-Strambi L., Pirola L., Smirne S.: *Impairment of memory and plasma flunitrazepam levels*. Psychopharmacology. 1998, 140, 157-163.
3. Doderman A.M., Lidberg L.: *Flunitrazepam (Rohypnol) abuse in combination with alcohol causes premeditated, grievous violence in male juvenile offenders*. J. Am. Acad. Psychiatry Law. 1999, 27, 83-99.
4. Drummer D., Syrjanen M., Cordner S.: *Deaths involving the benzodiazepines, flunitrazepam*. Am. J. Forens. Med. Path. 1993, 14, 238-243.
5. El Mahjoub A., Staub Ch.: *High-performance liquid chromatography determination of flunitrazepam and its metabolites in plasma by use column switching technique: comparison of two extraction columns*. J. Chromat.B., 2001, 754, 271-283.
6. El Sohly M.A., Feng S., Salamone S.J., Brenneisen R.: *GC-MS determination of flunitrazepam and its major metabolite in whole blood and plasma*. J. Anal. Toxicol. 1999, 23, 468-489.
7. El Sohly M.A., Feng S., Salamone S.J., Wu R.: *A sensitive GC-MS procedure for the analysis of flunitrazepam and its metabolites in urine*. J. Anal. Toxicol. 1997, 21, 335-340.
8. El Sohly M.A., Feng S., Salamone S.J., Wu R., Brenneisen R.: *GC/MS procedure for the analysis of flunitrazepam and its metabolites in urine*, J. Anal. Toxicol. 1997, 21, 80-81.
9. El Sohly M.A., Salamone S.J.: *Prevalence of drug used in cases of alleged sexual assault*. J. Anal. Toxicol. 1999, 23, 141-146.
10. *Flunitrazepam (Rohypnol) roofies*. Drug Enforcement Administration of the US Department of Justice, 2000. <http://www.usdoj.gov/dea/pubs/rohypnol.htm>.
11. Guan F., Seno H., Ishii A., Watanabe K., Kumazawa T., Hattori H., Suzuki O.: *Solid-phase microextraction and GC-ECD of benzophenones for detection of benzodiazepines in urine*. J. Anal. Toxicol. 1999, 23, 54-61.

12. Hindmarsh J., Brinkman R.: *Trends in the use of alcohol and other drugs in cases of sexual assault*. Human Psychopharm. Clin. Exper. 1999, 14, 225-231.
13. Mullins M.E.: *Laboratory confirmation of flunitrazepam in alleged cases of date rape*. Acad. Emerg. Med. 1999, 6, 966-968.
14. Negrusz A., Moore C.M., Stockham T.L., Poiser K.R., Kern J.L., Palparthy R., Ngoc Lau T.Le, Janiceak P.G., Levy N.A.: *Elimination of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in urine after a single dose of Rohypnol*. J. Forensic Sci. 2000, 45, 1031-1040 .
15. Negrusz A., Moore Ch.M., Hinkel K.B., Stockham T.L., Verma M., Strong M.J., Janicak P.G.: *Deposition of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in hair after a single dose of Rohypnol[®]*. J. Forensic. Sci. 2001, 46, 1143-1151.
16. Raymon L.P., Steele B.W., Walls H.C.: *Benzodiazepines in Miami Dade County, Florida driving under influence (DUI) cases (1995-1998) with emphasis on Rohypnol: GC/MS confirmation, pattern of use, psychomotor impairment, and results of Florida legislation*. J. Anal. Toxicol. 1999, 23, 490-499.
17. Slaughter L.: *Involvement of drugs in sexual assault*. J. Reprod. Med. 2000, 45, 425-430.
18. Smith K.M.: *Drug used in acquaintance rape*. J. Am. Pharmac. Assoc. 1999, 39, 519-525.
19. Szukalski B., Błachut D., Bykas M., Szczepańczyk S., Taracha E.: *Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) i jego lakton (GBL) – groźne związki psychoaktywne. Własności i metabolizm, Alkoholizm i Narkomania*. 2001, 14, 185-193.
20. Szukalski B., Błachut D., Bykas M., Szczepańczyk S., Taracha E.: *Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) i jego lakton (GBL) – groźne związki psychoaktywne. Metody rozdziału i identyfikacji GC/MS i FTIR*. Alkoholizm i Narkomania. 2001, 14, 341-354
21. Wells D.: *Drug administration and sexual assault: sex in a glass*. Sci. Justice, 2001, 41, 197-199